DLX1 对 BMP9 诱导的间充质干细胞 C3H10T1/2 成骨分化的影响*

徐丽，吉彩霞，刘晓骅，喻婷婷，罗进勇**

（重庆医科大学检验医学院 重庆医科大学检验医学教育部重点实验室 重庆 400016）

摘要 目的：分析和确认转录因子DLX1在骨形态发生蛋白9（Bone Morphogenetic Protein 9，BMP9）诱导的间充质干细胞C3H10T1/2成骨分化中的作用。方法：首先，BMP9腺病毒感染C3H10T1/2细胞，RT-PCR和Western Blot检测下DLX1表达变化；随后，利用重组腺病毒技术分别过表达DLX1和RNA干扰（RNA Intenference，RNAi）抑制DLX1的表达，并利用碱性磷酸酶（Alkaline Phosphatase，ALP）染色、钙盐沉积实验（茜素红染色），免疫细胞化学检测骨钙素（Osteocalcin，OCN）表达和裸鼠皮下异位成骨实验分析DLX1对于BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化的影响。荧光素酶报告基因实验和Western Blot分析DLX1对于BMP9诱导的C3H10T1/2细胞Smad1/5/8信号途径的影响。结果：BMP9可以促进C3H10T1/2细胞中DLX1基因和蛋白表达水平；过表达DLX1在体外可进一步促进BMP9诱导的C3H10T1/2细胞的ALP活性、钙盐沉积以及OCN的表达，过表达DLX1亦可促进BMP9诱导的裸鼠皮下异位成骨；反之，RNAi抑制DLX1表达后，由BMP9诱导的C3H10T1/2细胞的ALP活性、钙盐沉积、OCN表达和裸鼠皮下异位成骨均相应均受到抑制。过表达DLX1可进一步增强BMP9诱导的C3H10T1/2细胞中Smad/1/5/8的转录调控活性，RNAi降低DLX1表达则可抑制BMP9诱导Smad/1/5/8的转录调控活性。但是，无论过表达DLX1和RNAi降低DLX1表达均不会对BMP9诱导的Smad/1/5/8磷酸化造成影响。结论：DLX1可以调节BMP9诱导的间充质干细胞C3H10T1/2细胞成骨分化，其调节作用可能是通过影响Smad1/5/8信号的转录调控活性而实现的。

关键词 间充质干细胞 骨形态发生蛋白 同源异形盒基因 DLX1 成骨分化

中图分类号 Q291;Q2

Effects of DLX1 on BMP9-induced Osteogenic Differentiation of C3H10T1/2 Mesenchymal Stem Cells

XU Li, JI Cai-Xia, LIU Xiao-Hua, YU Ting-Ting, LUO Jin-Yong

(Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics，Ministry of Education，Chongqing Medical University, Chongqing, China 400016)

*基金项目：国家自然科学基金（31071304，81272006）
*通信作者: luojinyong@sina.com

Abstract Objective: To confirm the effects of DLX1 on BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. Methods: C3H10T1/2 cells were infected with recombinant adenoviruses expressing BMP9. Expression level of DLX1 upon BMP9 stimulation was measured by RT-PCR and Western blot. Then, the effects of DLX1 on BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 cells were determined by ALP staining, Alizarin red S staining, immunocytochemical and entopic bone formation assay. Luciferase reporter assay and Western Blot were conducted to analyze the activation level of Smad1/5/8 signal. Results: BMP9 increased the DLX1 expression of C3H10T1/2 cells. BMP9-induced ALP activity, calcium deposition and OCN expression of C3H10T1/2 cells *in vitro* was enhanced by overexpression of DLX1, but was inhibited by RNAi of DLX1. Overexpression of DLX1 led to an increase in new bone formation compared with the BMP9 group, however, RNAi of DLX1 resulted in a decrease in new bone formation *in vivo*. Moreover, BMP9-induced activation of Samd1/5/8 were accordingly increased along with overexpression of DLX1, and yet decreased along with DLX1 RNAi. Conclusions: Collectively, these above results implied us that DLX1 may play a private role in regulating BMP9-induced osteogenic differentiation of MSCs at last partly through Smad1/5/8 signal activation.

间充质干细胞（Mesenchymal Stem Cells, MSCs）是一类具有自我更新和多向分化潜能的成体干细胞，在骨髓中含量尤为丰富，在适宜条件下可向骨、软骨、肌肉等组织分化[1]。目前 MSCs 已成为骨组织工程重要的种子细胞。骨形态发生蛋白（Bone Morphogenetic Proteins, BMPs）属于转化生长因子β（Transforming Growth Factors β, TGFβ）超家族成员，因其具有诱导骨形成的能力而得名[2]，在众多 BMPs 中，除 BMP2，BMP4，BMP6 和 BMP7 外，BMP9 也被证实具有极强的诱导 MSCs 成骨分化的作用[3]。但其相关的分子机制还不甚清楚。

DLX（Distal-less Homeobox）属于同源异形盒基因家族，在脊椎动物动物中广泛存在并具有高度保守性，DLX 家族包括至少 6 个成员即 DLX1~DLX6[4]。DLX 家族成员在胚胎和器官发育、细胞分化、肿瘤发生等领域均发挥重要的调

控作用[5-8]。在 DLX 家族中，DLX5 是公认的成骨分化的关键因子[9]，也是 BMP9 诱导成骨分化时的重要调节分子[10]。而 DLX2 和 DLX3 等也被证实与骨形成关系密切[11,12]。然而，作为 DLX 家族成员，DLX1 是否也与骨形成和成骨分化有关，目前知之甚少。因此，本研究旨在观察 DLX1 对 BMP9 诱导的 MSCs 成骨分化的影响，并初步探讨潜在分子机制。

1 材料与方法

1. 1 材料

BMP9 腺病毒（Ad-BMP9）、和对照腺病毒（Ad-GFP）由芝加哥大学分子肿瘤实验室何通川教授惠赠；DLX1 过表达腺病毒（Ad-DLX1）、DLX1 的 RNAi 腺病毒（Ad-siDLX1），荧光素酶报告质粒 p12xSBE 由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存；小鼠间充质干细胞株 C3H10T1/2 购自美国典型菌种保藏中心（ATCC）；碱性磷酸酶（ALP）定量检测试剂盒购自 Clontech 公司；napthol AS-MX phosphate、维生素 C 和β-磷酸甘油和茜素红 S 购自 Sigma 公司；RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司；MMLV 逆转录酶购自 Takara 公司；PCR 引物由 Takara 公司合成；DMEM 高糖培养基和优质胎牛血清购自 Hyclone 公司。其它试剂均为进口分装或国产分析纯。

实验动物选用 3-4 周龄的健康雌性免疫缺陷型 BALB/c 裸鼠，购自重庆医科大学实验动物中心，室温喂养于无菌层流动物房内，空气湿度为 60%左右，饲料和水消毒后自由进食。

1. 2 方法

1.2.1 细胞培养　C3H10T1/2 细胞用 DMEM 完全培养基，在 37℃、5%CO_2 细胞培养箱中进行培养，待细胞融合度达 80%左右时，用胰蛋白酶消化，进行传代。

1.2.2 细胞总RNA的提取和RT-PCR　将C3H10T1/2细胞接种至T-25细胞培养瓶中，待细胞密度为30%左右时，分别加入Ad-BMP9和Ad-GFP腺病毒感染（感染率30%），48小时观察到荧光表达后，Tirizol法提取细胞总RNA（按操作说明书进行）。随后进行RT-PCR检测DLX1的表达，引物序列如下：DLX1 Fwd Primer：TGTCTCCTTCTCCCATGTCC，DLX1 Rev Primer: GAACTGATGTAGGGGCTGGA。

1.2.3 ALP 活性测定　把 C3H10T1/2 细胞按 2×10^4/孔的数量接种至 24 孔板，待细

胞融合度达 30%左右时加入相应腺病毒（感染率 30%），8h 后换液，随后连续培养 7d 后进行 ALP 染色（按说明书进行）。

1.2.4 钙盐沉积实验 把 C3H10T1/2 细胞按 2×10⁴/孔的数量接种至 24 孔板，待细胞融合度达 30%左右时加入相应腺病毒（感染率 30%），8h 后换液，随即连续培养 14d 后，进行茜素红染色，方法如下：弃去培养基，用 PBS 洗三次，每孔加入 0.05%戊二醛溶液 300μl 固定 10min，吸去戊二醛并用 ddH2O 洗三次，然后加入 0.04%的茜素红 S，在显微镜下观察，待出现红色颗粒物质堆积时，倒掉染液，加 ddH2O 终止反应，再用 ddH2O 清洗一遍，显微镜下观察并成像。

1.2.5 Western Blot C3H10T1/2 细胞接种于直径 100mm 的培养皿中，待细胞贴壁后加入相应腺病毒((感染率 30%)，48h 后裂解细胞并提取蛋白，经 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭液封闭、一抗（1：500 稀释）4℃孵育过夜、二抗（1:5000 稀释）37℃孵育 1h 等过程后，显影成像保存。

1.2.6 免疫细胞化学 C3H10T1/2细胞按2×104/孔接种于24孔板，待细胞融合度达30%左右时加入相应腺病毒（(感染率30%)，7d后进行免疫细胞化学染色。步骤如下：吸弃培养基，PBS洗两次，4%多聚甲醛固定10min，PBS洗两次；0.25%TriTonX-100室温孵10min，PBS洗两次；3%H_2O_2室温孵育10min，PBS洗三次，每次3min；1:20稀释后的OCN一抗在4℃孵育过夜，PBS洗3次，每次3min；1:50稀释后的二抗37℃孵育10-15min，PBS洗3次，每次3min；DAB显色，室温5min后终止，ddH_2O冲洗2次，苏木精复染3min，ddH2O冲洗2次，显微镜下观察。

1.2.7 荧光素酶报告基因实验 C3H10T1/2 细胞接种于 T-25 细胞培养瓶中，细胞融合度达约 30%时，将 3 μg 荧光素酶报告质粒 p-12xSBE 与 15μl 脂质体混合，加入到 250μl 无血清无双抗 DMEM 培养基中，孵育 15min 后转染 C3H10T1/2 细胞。转染 6h 后，更换培养液，继续培养细胞过夜。随后铺入 24 孔板中，待细胞贴壁后加入相应腺病毒（(感染率 30%)。12h 或 24h 后裂解细胞离心，取上清与荧光素酶底物反应，定量检测。

1.2.8 动物实验和组织化学染色 C3H10T1/2 细胞接种至 100mm 培养皿中，待细胞融合度约为 40%时，加入适量相应腺病毒感染（感染率 30%，动物实验共分为 3 组，分别为：BMP9 组，BMP+DLX1 组、BMP9+siDLX1 组），感染后继续培养 24h，弃去培养基收集取细胞，用含 100unit/ml 青霉素和 100mg/l 链霉素的 PBS

重悬细胞，并接种于 BALB/c 裸鼠背部，每周观察裸鼠皮下成骨包块的大小。细胞接种 4 周后，断颈处死裸鼠，取皮下包块观察大小并成像。10%甲醛固定裸鼠皮下骨组织包块，并用 Micro-CT (VivaCT 40，瑞士)扫描，相应软件(Micro-CT 516.1)进行三维重建和数据分析。皮下包块经脱钙，石蜡包埋切片，H&E 染色观察包块内的成骨情况，成像并保存。

1.2.9 统计分析　计量资料以均数±标准差（x±s）表示，组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 t 检验，统计学分析用 SSPS17 软件包处理。

2　结果

2．1　BMP9 促进 C3H10T1/2 细胞中 DLX1 的表达

RT-PCR 检测 BMP9 腺病毒感染（感染率 30%）C3H10T1/2 细胞后 DLX1 的基因表达水平，结果显示：BMP9 可以上调 C3H10T1/2 细胞中 DLX1 基因的表达（图 1A，图 1B）。Western Blot 检测 BMP9 腺病毒感染后，C3H10T1/2 细胞中 DLX1 的蛋白表达水平，结果显示，BMP9 也可增强 C3H10T1/2 细胞中 DLX1 蛋白的表达（图 1C，图 1D）。因此，BMP9 可促进 C3H10T1/2 细胞中 DLX1 的表达。

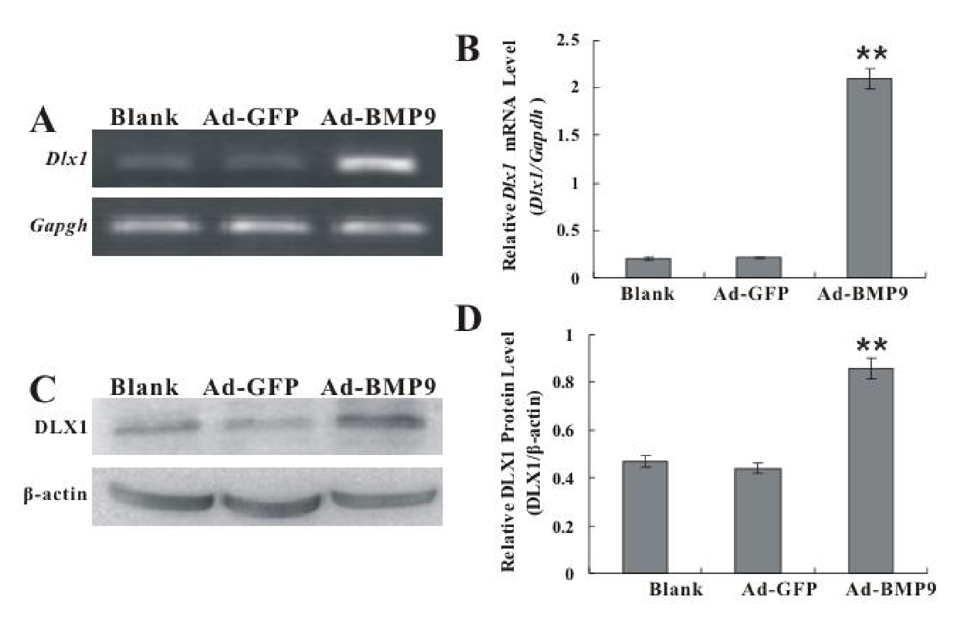


图 1　BMP9 上调 C3H10T1/2 细胞中 DLX1 的表达

Fig.1　BMP9 enhances the expression level of DLX1 in C3H10T1/2 cells

(A) and (B) the gene expression level of DLX1 was detected by RT-PCR after exogenous Ad-BMP9 infection for 48 h; (C) and (D) the protein expression level of DLX1 was detected by Western blot after exogenous Ad-BMP9 infection for 72 h. GAPDH and β-actin were used as

loading control, separately. **P <0.01 compared with Blank and Ad-GFP

2.2 过表达 DLX1 可促进 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化

首先，Western Blot 验证 DLX1 过表达腺病毒可在 C3H10T1/2 细胞高表达 DLX1 蛋白(图 2A)。随后，利用 DLX1，BMP9，BMP9+DLX1 分别处理 C3H10T1/2 细胞，染色检测早期成骨分化指标 ALP 活性发现：虽然 DLX1 单独处理并不会影响 C3H10T1/2 细胞的 ALP 活性，但是 DLX1 却可以进一步促进由 BMP9 诱导的 ALP 活性（图 2B）。利用茜素红染色和免疫细胞化学分别检测晚期成骨指标钙盐沉积和 OCN 表达，结果显示：DLX1 可以增强由 BMP9 诱导的钙盐沉积（图 2C）和 OCN 表达（图 2D）。因此，过表达 DLX1 可促进 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化

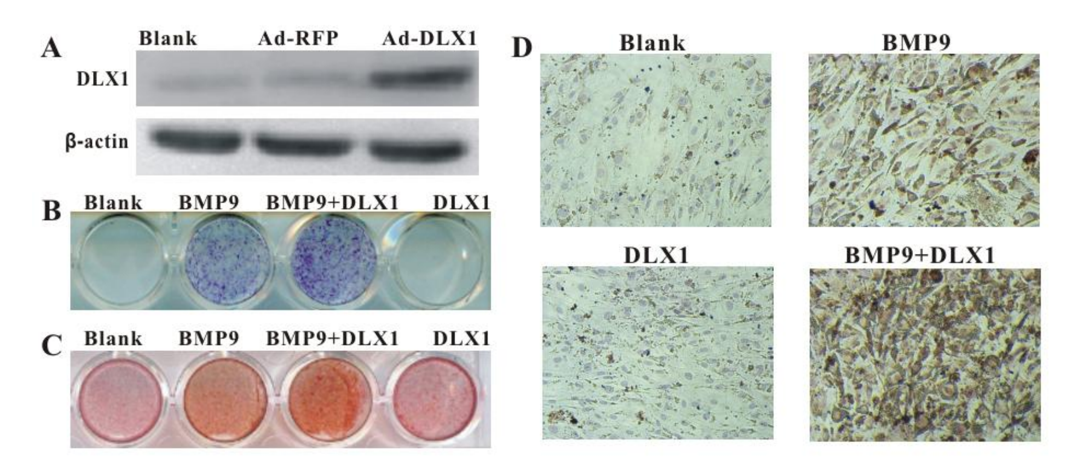


图 2 DLX1 增强 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化

Fig.2 DLX1 promotes BMP9-induced osteogenic differentiation in C3H10T1/T cells

(A) The expression of DLX1 was detected by Western blot after exogenous Ad-DLX1 adenovirus infection for 72 h in C3H10T1/2 cells. (B) Overexpression of DLX1 promoted BMP9-induced ALP activity in C3H10T1/2 cells (ALP staining assay). (C) Overexpression of DLX1 promoted BMP9-induced calcium deposition in C3H10T1/2 cells (Alizarin Red S staining). (D) Overexpression of DLX1 promoted BMP9-induced OCN expression in C3H10T1/2 cells (Immunocytochemistry assay, x150).

2.3 RNAi 抑制 DLX1 可减弱 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化

首先，Western Blot 验证 DLX1 的 RNAi 腺病毒（Ad-siDLX1）可抑制 C3H 10T1/2 细胞中 DLX1 的表达（图 3A）。随后 ALP 染色结果显示：RNAi 抑制 DL X1 表达可导致 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞 ALP 活性降低（图 3B）。随后利用茜素红染色和免疫细胞化学分别检测晚期成骨指标钙盐沉积和 OCN 表达，结果显示：RNAi 抑制 DLX1 表达后，由 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞钙盐沉积（图 3C）和 OCN 表达（图 3D）相应减弱。因此，抑制 DLX1 表达，可减弱 BMP9

诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化。

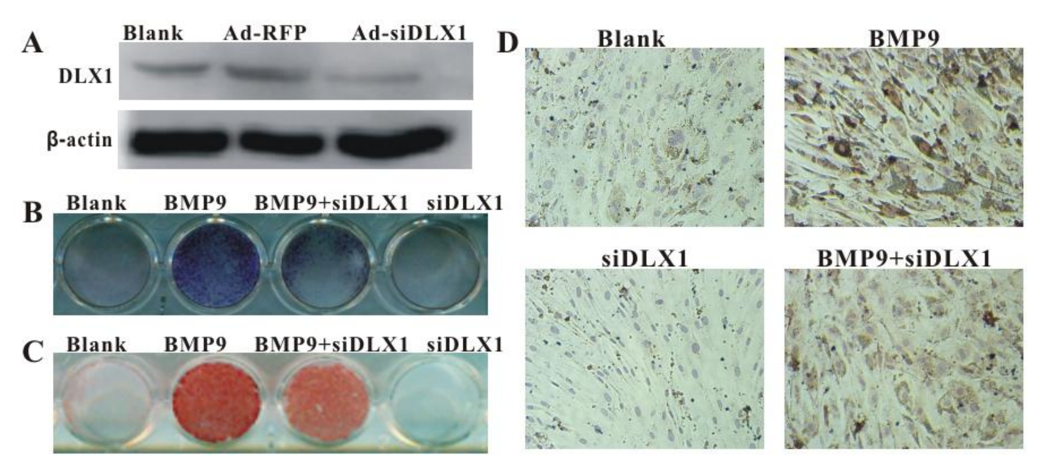


图 3 RNAi 抑制 DLX1 表达可减弱 BMP9 诱导 C3H10T1/2 细胞成骨分化

Fig.3 Inhibition of DLX1 by RNAi decreases BMP9-induced osteogenic differentiation in C3H10T1/T cells

(A) The expression of DLX1 was detected by Western blot after exogenous Ad-siDLX1 adenovirus infection for 72 h in C3H10T1/2 cells. (B) Inhibition of DLX1 by RNAi decreased BMP9-induced ALP activity in C3H10T1/2 cells (ALP staining assay). (C) Inhibition of DLX1 by RNAi inhibited BMP9-induced calcium deposition in C3H10T1/2 cells (Alizarin Red S staining). (D) Inhibition of DLX1 by RNAi reduced BMP9-induced OCN expression in C3H10T1/2 cells (Immunocytochemistry assay, x150).

2.4 DLX1 可影响 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞在裸鼠皮下异位成骨

最后，裸鼠皮下异位成骨进一步分析 DLX1 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞成骨分化的影响。首先，发现与 BMP9 组相比，BMP9+siDLX1 的皮下包块明显较小，而 BMP9+DLX1 组皮下包块则进一步增大（图 4A）。Micro-CT 分析发现，与 BMP9 组相比，BMP9+siDLX1 组的包块体积（TV）、骨体积（BV）以及骨体积与总体积中的比值（BV/TV）相应下降（图 4B，图 4C），而 BMP9+DLX1 组皮下包块的 TV，BV 及 BV/TV 均进一步增加（图 4B，图 4C）。H&E 染色显示：BMP9+siDLX1 组中骨小梁的数量减少，而 BMP9+DLX1 组中骨小梁的数量进一步增加。因此，过表达 DLX1 可使 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞在裸鼠皮下异位成骨进一步增强，而 RNAi 抑制 DLX1 表达后，可使 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞在裸鼠皮下异位成骨减弱。

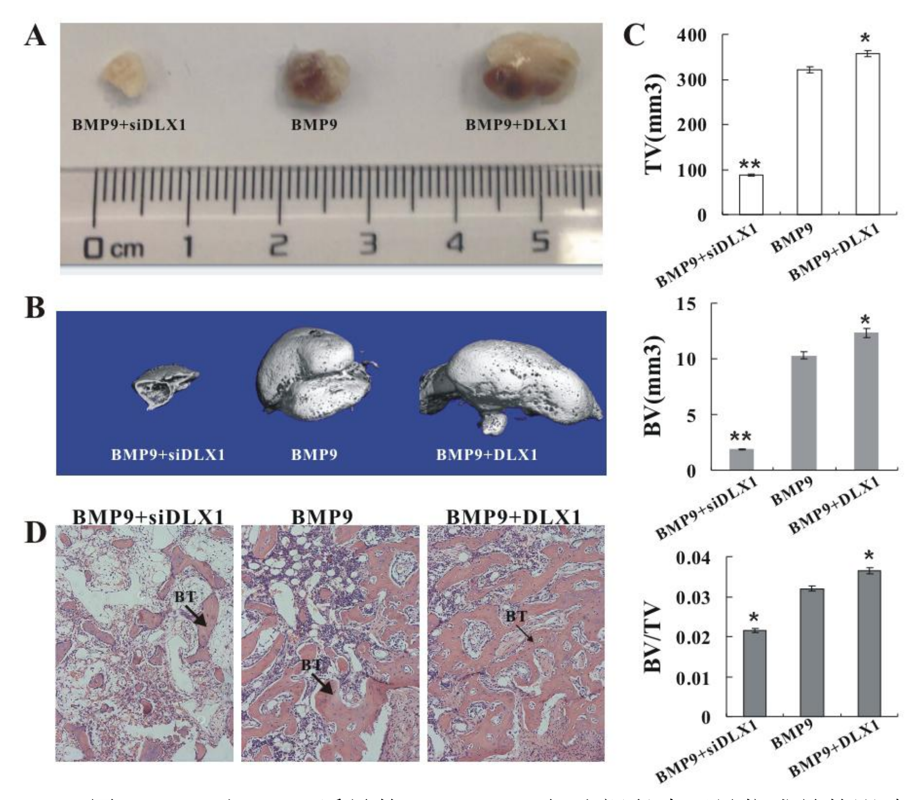


图 4 DLX1 对 BMP9 诱导的 C3H10T1/2 细胞裸鼠皮下异位成骨的影响

Fig.4 The effects of DLX1 on BMP9-induced entopic bone formation of C3H10T1/2 cells

(A) Gross image of retrieved sample. (B) 3D reconstruction of bone masses by Micro-CT analysis. (C) Total volume (TV), bone volume (BV) and BV/TV of retrieved sample by Micro-CT analysis. (D)H&E staining of retrieved sample (x150, BT: Bone Trabecula). *P <0.05 compared with BMP9, **P <0.01 compare with BMP9

2.5 DLX1 可影响 BMP9 诱导的 Smad1/5/8 信号的活化

BMP9 可以通过经典的 Smad1/5/8 信号发挥诱导成骨分活性。因此，利用荧光素酶报告基因实验确实 DLX1 是否影响 BMP9 诱导的 Smad1/5/8 信号的活化，结果显示：过表达 DLX1 可促进 BMP9 诱导的 Smad1/5/8 的转录调控活性，使得荧光素酶活性增加；反之，RNAi 抑制 DLX1 后，BMP9 诱导的 Smad1/5/8 的转录调控活性降低。故 DLX1 可影响 BMP9 诱导的 Smad1/5/8 信号的活化。然而，通过 Western blot 检测却发现：无论过表达 DLX1 和 RNAi 抑制 DLX1，BMP9 诱导的 Smad1/5/8 磷酸化并未发生改变。

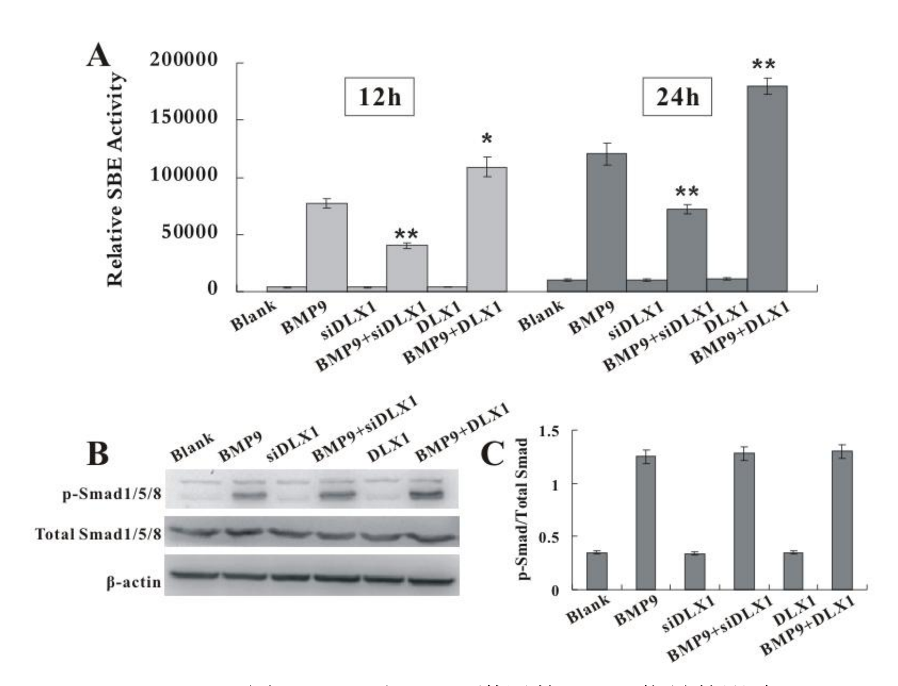


图 4 DLX1 对 BMP9 激活的 Smad 信号的影响

Fig.4 The effects of DLX1 on BMP9-induced Smad activation

(A) The effects of DLX1 on BMP9-induced Smad1/5/8 transcriptional activity (luciferase reporter assay). (B) and (C) The effects of DLX1 on BMP9-induced Smad1/5/8 phosphorylation (Western Blot). *P <0.05 compared with BMP9, **P <0.01 compare with BMP9

3 讨论

定向诱导种子细胞如 MSCs 等成骨分化，一直是骨组织工程中的一个核心问题。BMPs 家族中的 BMP2、BMP4、BMP6 和 BMP7 等均可诱导 MSCs 成骨分化。近来研究表明，BMPs 家族中的另一成员 BMP9 具有更为强效的促进 MSCs 成骨分化的能力，甚至超过已在临床使用的 BMP2 和 BMP7[3]。在相关机制研究中发现：BMP9 可活化 Smad1/5/8、MAPK、CREB/PKA 等信号途径[13,14]，而 Runx2、Id、CTGF 等转录因子是 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化时重要的调控分子[13,14]。尽管如此，由于对 BMP9 诱导成骨的研究起步相对较晚，目前对于 BMP9 诱导 MSCs 成骨分化分子机制的了解还不够深入。

在骨发育的晚期阶段，所有DLX家族成员在分化的骨组织中都有表达，表明了DLX家族在骨形成中的潜在重要作用[5,15]。DLX家族中DLX5是成骨分化的关键调控因子，基因敲除DLX5可以导致骨形成障碍[16]，DLX5也是BMP9诱导成骨分化的重要靶分子[10]。DLX2、DLX3、DLX4均已被证实与成骨分化相关[17]。DLX1是同源异形盒DLX家族的重要成员，DLX1在发育和细胞分化方面的研究，主要集中于神经分化领域[18-20]，但在成骨分化研究中报道极少。在本研究中发现，

BMP9可以促进间充质干细胞C3H10T1/2中DLX1的表达，因此，DLX1极可能也有调节BMP9诱导成骨分化的作用。随后的体外和体内实验均证实，DLX1可调控BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化，上调DLX1表达可以促进BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化，下调DLX1表达可抑制BMP9诱导的C3H10T1/2细胞成骨分化。在裸鼠皮下异位成骨实验中，发现过表达的DLX1可以促进BMP9诱导的裸鼠皮下异位成骨，成骨数量和质量明显高于BMP9单独处理组，H&E染色可见骨小梁明显增多；而RNAi抑制DLX1的表达则导致BMP9诱导的成骨数量和质量下降，使得骨小梁生成减少。

Smad1/5/8信号是BMP9诱导成骨分化的重要信号途径之一[14]，那么，DLX1是否会影响Smad1/5/8信号的活化呢。结果显示：DLX1可以影响BMP9诱导的Smad1/5/8的转录调控活性，但是对Smad1/5/8的磷酸化（Smad1/5/8的活化形式）并无明显影响。由此推测，DLX1可能以辅助因子（Co-factor）的方式促进Smad1/5/8的转录调控活性，而非以直接改变Smad1/5/8磷酸化来发挥作用。

总之，以上结果表明DLX1可调控BMP9诱导的MSCs成骨分化，其调控作用可至少通过影响Smad1/5/8信号途径来实现。而实际上，BMP9调控MSCs成骨分化的信号转导网络涉及众多信号途径和下游的多种转录因子，具有高度复杂性。在后期的实验工作中将进一步分析DLX1与该网络中的其它信号途径（如MAPK等）的交互对话，及与其它成骨关键转录因子（如Runx2等）的相互作用。

参考文献

[1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 1999, 284(5411):143-147.

[2] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science, 1965, 150(3698):893-839.

[3] Kang Q, Sun MH, Cheng H, *et al*. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. Gene Ther, 2004, 11(17):1312-1320.

[4] Panganiban G, Rubenstein JL. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes. Development, 2002, 129(19):4371-4386.

[5] Merlo GR, Zerega B, Paleari L, *et al*. Multiple functions of Dlx genes. Int J Dev Biol, 2000, 44(6):619-626.

[6] Zhang L, Yang M, Gan L, *et al*. DLX4 upregulates TWIST and enhances

tumor migration, invasion and metastasis. Int J Biol Sci, 2012, 8(8):1178-1187.

[7] Dai X, Iwasaki H, Watanabe M, *et al*. Dlx1 transcription factor regulates dendritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. Eur J Neurosci, 2014, 39(4):531-547.

[8] McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning. Cell, 1992, 68(2):283-302.

[9] Nishimura R, Hata K, Matsubara T, *et al*. Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. J Biochem, 2012,151(3):247-254.

[10] Liu C, Weng Y, Yuan T, *et al*. CXCL12/CXCR4 signal axis plays an important role in mediating bone morphogenetic protein 9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Int J Med Sci, 2013, 10(9):1181-1192.

[11] Sun H, Liu Z, Li B, *et al*. Effects of DLX2 overexpression on the osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells. Exp Ther Med, 2015, 9(6):2173-2179.

[12] Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, *et al*. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. Mol Cell Biol, 2004, 24(20):9248-9261.

[13] 罗进勇. 骨形态发生蛋白 9 促成骨的分子机制. 重庆医学, 2016, 45(9):1153-1162.

Luo J Y. The molecular mechanism of BMP9-induced osteogenesis. Chongqing Medicine, 2016, 45(9):1153-1162.

[14] Lamplot JD, Qin J, Nan G, *et al*. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. Am J Stem Cells, 2013, 8;2(1):1-21.

[15] Simeone A, Acampora D, Pannese M, *et al*. Cloning and characterization of two members of the vertebrate Dlx gene family. Proc Nat Acad Sci USA, 1994, 15;91(6):2250-2254.

[16] Acampora D, Merlo GR, Paleari L, *et al*. Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5. Development, 1999, 126(17):3795-3809.

[17] Levi G, Gitton Y. Dlx genes and the maintenance of bone homeostasis and skeletal integrity. Cell Death Differ, 2014, 21(9):1345-1346.

[18] Dai X, Iwasaki H, Watanabe M, *et al*. Dlx1 transcription factor regulates d

endritic growth and postsynaptic differentiation through inhibition of neuropilin-2 and PAK3 expression. Eur J Neurosci, 2014, 39(4):531-547.

[19] Jones DL, Howard MA, Stanco A, *et al*. Deletion of Dlx1 results in reduced glutamatergic input to hippocampal interneurons. J Neurophysiol, 2011, 105(5):1984-1991.

[20] Cobos I, Calcagnotto ME, Vilaythong AJ, *et al*. Mice lacking Dlx1 show subtype-specific loss of interneurons, reduced inhibition and epilepsy. Nat Neurosci, 2005, 8(8):1059-1068.